

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/11962

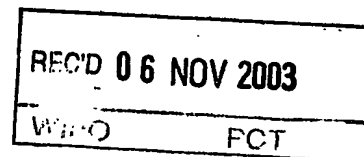
19.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月20日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-274926
[ST. 10/C]: [JP2002-274926]



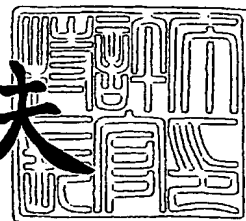
出 願 人
Applicant(s): 住友製薬株式会社
株式会社高研

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月23日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02406SP

【提出日】 平成14年 9月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/00

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市飛田 1 丁目 1 - 5 2

 【氏名】 安東 由喜雄

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市稗田町 5 - 6 8 - 8 0 1

 【氏名】 中村 政明

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府茨木市蔵垣内 1 丁目 3 番 4 5 号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 永原 俊治

【特許出願人】

 【識別番号】 000183370

 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号

 【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 591071104

 【住所又は居所】 東京都豊島区目白 3 丁目 1 4 番 3 号

 【氏名又は名称】 株式会社高研

【代理人】

 【識別番号】 100092266

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 鈴木 崇生

 【電話番号】 06-6838-0505

【選任した代理人】

【識別番号】 100104422

【弁理士】

【氏名又は名称】 梶崎 弘一

【電話番号】 06-6838-0505

【選任した代理人】

【識別番号】 100105717

【弁理士】

【氏名又は名称】 尾崎 雄三

【電話番号】 06-6838-0505

【選任した代理人】

【識別番号】 100104101

【弁理士】

【氏名又は名称】 谷口 俊彦

【電話番号】 06-6838-0505

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 074403

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 0212735

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 部位特異的遺伝子変換促進剤および遺伝子疾患治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子変換促進剤。

【請求項 2】 少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子疾患治療剤。

【請求項 3】 コラーゲンが水溶性コラーゲンである、請求項 1 または 2 に記載の促進剤または治療剤。

【請求項 4】 水溶性コラーゲンがアテロコラーゲンである、請求項 3 に記載の促進剤または治療剤。

【請求項 5】 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドが少なくとも 20 塩基からなるオリゴヌクレオチドである、請求項 1 ～ 4 いずれかに記載の促進剤または治療剤。

【請求項 6】 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドが RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドまたは DNA オリゴヌクレオチドである、請求項 1 ～ 5 いずれかに記載の促進剤または治療剤。

【請求項 7】 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドが、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1 ～ 3 塩基対のミスマッチ対合を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、請求項 5 または 6 に記載の促進剤または治療剤。

【請求項 8】 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドが、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1 ～ 3 塩基の欠失または挿入を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、請求項 5 または 6 に記載の促進剤または治療剤。

【請求項 9】 前記ミスマッチ対合がオリゴヌクレオチドの中央部に位置する、請求項 7 に記載の促進剤または治療剤。

【請求項 10】 前記塩基の欠失または挿入がオリゴヌクレオチドの中央部に位置する、請求項 8 に記載の促進剤または治療剤。

【請求項 11】 剤型が溶液状である、請求項 1～10 いずれかに記載の促進剤または治療剤。

【請求項 12】 リン酸塩を 0.01M～0.1M の範囲で含有する請求項 11 記載の促進剤または治療剤。

【請求項 13】 ナトリウム塩を 0.07M～0.14M の範囲で含有する請求項 11 記載の促進剤または治療剤。

【請求項 14】 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体である請求項 11～13 いずれかに記載の促進剤または治療剤。

【請求項 15】 粒子状の会合体の長径が 300nm～50μm である請求項 14 記載の促進剤または治療剤。

【請求項 16】 コラーゲンを 0.01～1.0 重量% の範囲で含有する請求項 11～15 いずれかに記載の促進剤または治療剤。

【請求項 17】 コラーゲンを 0.01～0.25 重量% の範囲で含有する請求項 11～15 いずれかに記載の促進剤または治療剤。

【請求項 18】 コラーゲンを、0.01M～0.1M のリン酸塩および 0.07M～0.14M のナトリウム塩を含有する溶液に溶解し、これに同濃度のリン酸塩および同濃度のナトリウム塩を含有する遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド溶液を加えて 1～10℃ の温度下で攪拌することにより得られる部位特異的遺伝子変換促進剤または遺伝子治療剤。

【請求項 19】 剤型が固形状であり、遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体である請求項 1～10 いずれかに記載の促進剤または治療剤。

【請求項 20】 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体である請求項 19 に記載の促進剤または治療剤。

【請求項 21】 粒子状の会合体の長径が 300nm～50μm である請求項 20 に記載の促進剤または治療剤。

【請求項 22】 細胞の核内においてゲノム遺伝子上の特定の塩基を任意に変換する方法であって、請求項 1、3～21 いずれかに記載の遺伝子変換促進剤を当該細胞に接触させることを含む方法。

【請求項 23】 前記の細胞が哺乳動物細胞である請求項 22 に記載の方法

。

【請求項 24】 前記の細胞が酵母または真菌である請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】 少なくともコラーゲンとオリゴヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤。

【請求項 26】 リン酸塩を 0.01 M ~ 0.1 M の範囲で含有する請求項 25 に記載の核内局在化促進剤。

【請求項 27】 ナトリウム塩を 0.07 M ~ 0.14 M の範囲で含有する請求項 25 または 26 に記載の核内局在化促進剤。

【請求項 28】 前記オリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体である請求項 25 ~ 27 いずれかに記載の核内局在化促進剤。

【請求項 29】 粒子状の会合体の長径が 300 nm ~ 50 μ m である請求項 28 に記載の核内局在化促進剤。

【請求項 30】 コラーゲンを 0.01 ~ 1.0 重量% の範囲で含有する請求項 25 ~ 29 いずれかに記載の核内局在化促進剤。

【請求項 31】 コラーゲンを 0.05 ~ 0.25 重量% の範囲で含有する請求項 25 ~ 29 いずれかに記載の核内局在化促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、コラーゲンの新しい用途に関するものであり、詳しくは、コラーゲンとオリゴヌクレオチドを含有する、ゲノム遺伝子の部位特異的遺伝子変換促進剤等に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子治療は、遺伝子の変異または欠失により発症する遺伝子疾患を根本的に治療する方法として大きな期待が寄せられている。一般に、遺伝子治療ではウイルスベクター、リポソームベクターまたはプラスミド DNA ベクター等を用いて

細胞に治療に必要なタンパク質をコードした遺伝子を導入し、細胞のゲノム遺伝子に組み込む手法、あるいはゲノム遺伝子と共存させてタンパク質を発現させる手法が試みられているが、満足な治療効果が得られる例は少ない。この原因は、1) タンパク質全体をコードする大きなサイズの遺伝子をウイルスベクターあるいはプラスミドDNAに組み込んで発現させるのは困難であること、2) 導入する遺伝子をゲノム遺伝子に組み込まないアデノウイルスベクターやプラスミドDNAベクターを用いた場合には、安定した長期間の発現が得られないこと、3) レトロウイルスベクターは導入する遺伝子をゲノム遺伝子の不特定の位置に組み込むため、却って正常遺伝子の機能を喪失させる可能性があること、4) ウイルスベクターを用いた場合、ウイルスに由来するタンパク質が産生され、このタンパク質に対する免疫反応が惹起されて副作用が生じること、5) 更にプロモーターは細胞の特異性が高いため、遺伝子を発現できる細胞が限られることによると考えられている（例えば、非特許文献1 参照）。

【0003】

一方、遺伝子疾患では必要とされるタンパク質の遺伝子すべてが完全に欠失していることは稀で、多くの場合には遺伝子上の僅か一塩基が誤っているために異なるアミノ酸に置換されたり、一塩基が欠失あるいは挿入されているためにフレームシフトが生じて正常なタンパク質が産生されないことが原因となっている。例えば、家族性アミロイドポリニューロパチー(Familial amyloidotic polyneuropathy: FAP) は、遺伝子変異を起こしたトランスサイレチン(Transthyretin: TTR)、アポリポ蛋白A I、ゲルソリンを前駆蛋白とし、種々の臓器・組織にアミロイド沈着をきたす全身性アミロイドーシスの1つである。そのうち、127 個のアミノ酸から構成されるTTRの30番目のバリンがメチオニンへ変異した異型TTRがアミロイドとなり臓器障害がおこるFAP type I (FAP ATTR Val30Met) は、四肢の感覚障害や運動神経障害を伴う多発神経炎、立ちくらみ、発汗、涙液分泌低下などの自律神経障害、下痢や便秘などの消化器症状、心、腎、眼などの臓器障害などを主症状とする常染色体優性遺伝を呈する遺伝性アミロイドーシスである。本症は20～30代で発症し、約10年の経過で死の転帰をとる予後不良の疾患である（例えば、非特許文献2 参照）。

【0004】

FAPの原因蛋白であるTTRが主に肝臓で産生されることから、FAPの治療として肝移植が行われるようになった。肝移植によりFAPの症状の進行が停止し、一部の自律神経症状の改善を認めることから、肝臓での異型TTRの産生を抑制することは、FAPの有効な治療法であることが明らかになった。しかしながら、肝移植をすべての患者に適応することは様々な理由から不可能である。しかも、網膜での異型TTRの産生は抑制されないため、肝移植後も眼病変が進行するという問題点もある。そこで、これに代わる治療法として、肝臓、網膜での異型TTRの産生を抑制する遺伝子治療の確立が不可欠であると考えられる。

【0005】

他方、ヒトゲノムプロジェクトによってヒトの全遺伝子配列が解読されるようになり、個体間で多くの一塩基変異があることが見出され、更にこの一塩基変異が疾病の罹患率や薬剤の感受性に大きく影響することが明らかになりつつある。従って遺伝子治療を実用化するには、ゲノム遺伝子上の特定の一塩基変異を修正する技術の確立が必要である。

【0006】

1996年、Kmiec らによって特定の塩基を変異する画期的な方法が発表された（例えば非特許文献3参照）。RNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドを用いるこの方法は、変異させたい遺伝子の領域と二重鎖を形成するオリゴヌクレオチドを細胞内に導入してゲノム遺伝子と相同組換えを生じさせることでゲノム遺伝子を変異させる方法であり、リンパ芽球細胞にオリゴヌクレオチドを導入して遺伝子疾患である鎌状細胞貧血の原因遺伝子である β -グロビンの遺伝子を変異させた。この報告以降、オリゴヌクレオチドを用いて種々の細胞内で特定の塩基を標的とした遺伝子変異が行えることが実証された。更にin vivo においては、Krenらがラットの肝臓内で第9因子の遺伝子を変異させて血友病を治療できる可能性を示した（例えば非特許文献4参照）のに続いて、Cligler-Najjar症候群（例えば非特許文献5参照）、Duchenne型筋ジストロフィーの治療に使用できる可能性が示されるに至っている。

【0007】

また、最近DNAオリゴマーでもRNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドと同様にゲノム遺伝子の特定の塩基を変異できることが、細胞の抽出液中（例えば非特許文献6参照）、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)（例えば非特許文献7参照）で示され、遺伝子治療への活用が期待されている。

【0008】

一方、オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子治療を臨床的に実用化する上で最も大きな課題は、生体内の細胞へのオリゴヌクレオチドの送達方法である。実際、これまで行われたすべての研究では、エレクトロポレーション、ジーンガン、リポソーム、ポリカチオンなどの送達技術を用いたオリゴヌクレオチドの細胞内導入方法は、毒性や利便性などの問題があり臨床研究に供されたものはない。特に多くのリポソーム及びカチオン性ポリマーは、オリゴマーと混合した状態で長期間保存することが困難な上、調製時の手技に導入効率が大きく依存することはこの分野の研究者には良く知られた事実である。従って、オリゴヌクレオチドを安定かつ効率的に細胞内に導入してゲノム遺伝子を変換できると共に、安全で利便性の高い送達システムの開発が求められている。

【0009】

また、アンチセンスオリゴヌクレオチドの送達方法では、標的となるメッセンジャーRNAが主として細胞質に存在することから、オリゴヌクレオチドを細胞内の特定の部位に局在化することは求められなかった。一方、ゲノム遺伝子の変換を行うには、オリゴヌクレオチドを核内に導入、局在化させて遺伝子変換の効率を高める必要があり、オリゴヌクレオチドを効率的に細胞の核内に局在化させる送達システムの開発が望まれている。

【0010】

【非特許文献1】

Li-Wen Laiら、「Experimental Nephrology」1999 第7巻, p.11-1

4

【非特許文献2】

Bensonら、「Trends in Neurosciences」1989 第12巻, p.88-92

【非特許文献 3】

Kmiec ら、「Science」1996 第 273 巻, p.1386-1389

【非特許文献 4】

Kren ら、「Nature Medicine」1998 第 4 巻, p.285-290

【非特許文献 5】

Kren ら、「Proceeding of National Academy of Sciences USA」1999 第 96 巻, p.10349-10354

【非特許文献 6】

Gamper ら、「Nucleic Acids Research」2000 第 28 巻, p.4332-4339

【非特許文献 7】

Michael ら、「Nucleic Acids Research」2001 第 29 巻, p.4238-425

0。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、オリゴヌクレオチドを細胞内に効率的に導入して核内での局在化を促進する製剤、目的とするゲノム遺伝子の塩基配列の変換を促進する製剤および遺伝子疾患治療剤を提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）の患者の発症、病態および治療方法に関する研究に長年従事し、トランスサイレチン（TTR）遺伝子の点変異により TTR の 30 番目のバリンがメチオニンに変異した FAP タイプ I（FAP ATTR Val30Met）の遺伝子治療について鋭意検討した結果、下記要件を満たすことにより FAP を初めとする様々な遺伝子疾患の治療のみならず、インビトロでの部位特異的遺伝子変換にも有効な製剤を見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

即ち、本発明の要旨は、以下のとおりである。

【0014】

[1] 少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子変換促進剤、

[2] 少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子疾患治療剤、

前記コラーゲンは水溶性コラーゲンであることが好ましく、前記水溶性コラーゲンはアテロコラーゲンであることが好ましい、

前記遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドが少なくとも20塩基からなるオリゴヌクレオチドであることが好ましく、具体的にはRNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドまたはDNAオリゴヌクレオチドであることが好ましい、

前記遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドは、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基対のミスマッチ対合を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであること、あるいは、前記遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドは、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基の欠失または挿入を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであることが好ましい、

前記ミスマッチ対合は、オリゴヌクレオチドの中央部に位置すること、あるいは、前記塩基の欠失または挿入は、オリゴヌクレオチドの中央部に位置することが好ましい、

前記促進剤または治療剤は、その剤型が溶液状であることが好ましく、リン酸塩を0.01M～0.1Mの範囲で含有すること、ナトリウム塩を0.07M～0.14Mの範囲で含有することが好ましい、

また、前記促進剤または治療剤は、剤型が固形状であることが好ましい、

遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンは粒子状の会合体であり、粒子状の会合体の長径は300nm～50μmであることが好ましい、

溶液状の前記促進剤または治療剤は、コラーゲンを0.01～1.0重量%の範囲で含有すること、あるいはコラーゲンを0.01～0.25重量%の範囲で含有することが好ましい、

[3] コラーゲンを、0.01M～0.1Mのリン酸塩および0.07M～0.14Mのナトリウム塩を含有する溶液に溶解し、これに同濃度のリン酸塩およ

び同濃度のナトリウム塩を含有する遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド溶液を加えて1～10℃の温度下で攪拌することにより得られる部位特異的遺伝子変換促進剤または遺伝子治療剤、

〔4〕細胞の核内においてゲノム遺伝子上の特定の塩基を任意に変換する方法であって、前記遺伝子変換促進剤を当該細胞に接触させることを含む方法、

前記細胞は哺乳動物細胞、酵母または真菌であることが好ましい、

〔5〕少なくともコラーゲンとオリゴヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤、

前記核内局在化促進剤は、リン酸塩を0.01M～0.1Mの範囲で含有すること、ナトリウム塩を0.07M～0.14Mの範囲で含有することが好ましい、

前記オリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体であり、粒子状の会合体の長径が300nm～50μmであることが好ましい、

前記核内局在化促進剤は、コラーゲンを0.01～1.0重量%の範囲で含有すること、あるいはコラーゲンを0.05～0.25重量%の範囲で含有することが好ましい。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明の第一の態様は、少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子変換促進剤に関するものである。

【0016】

本発明において「コラーゲン」とは、通常、医療分野、化粧品分野、工業分野および食品分野で用いられているあらゆる「コラーゲン」を意味する。コラーゲンは、水溶性または可溶化コラーゲンを用いることが好ましい。水溶性コラーゲンは、酸性または中性の水や塩溶液に可溶であり、可溶化コラーゲンは、酵素により可溶化される酵素可溶化コラーゲン、酸により可溶化される酸可溶化コラーゲン、アルカリにより可溶化されるアルカリ可溶化コラーゲンがあり、いずれも孔サイズが1マイクロメートルのメンブレンフィルターを通過できることが好ましい。コラーゲンの水溶性はコラーゲンの架橋度に依存し、架橋度が高いほ

ど不溶化することから、本発明に使用するコラーゲンの架橋度は、例えば、3量体以下であることが好ましく、より好ましくは2量体以下である。コラーゲンの分子量は例えば、約30万から約90万が好ましく、約30万から約60万がより好ましい。コラーゲンはいかなる動物種から抽出されたものでも用いることができるが、好ましくは脊椎動物から抽出されたもの、さらに好ましくは哺乳類、鳥類、魚類から抽出されたもの、より好ましくは変性温度が高い哺乳類、鳥類から抽出されたコラーゲンが望ましい。コラーゲンのタイプもいかなるタイプのコラーゲンでも良いが、動物体内の存在量からI～V型が好ましい。具体的には例えば、哺乳動物の真皮から酸抽出したI型コラーゲンが挙げられ、より好ましくは例えば、仔牛の真皮から酸抽出したI型コラーゲン、遺伝子工学的に生産されるI型およびIII型コラーゲンなどが挙げられる。また、安全性の面から抗原性の高いテロペプチドを酵素的に除去したアテロコラーゲンあるいは遺伝子工学的に生産されるアテロコラーゲンが望ましい。また、必要に応じて側鎖を修飾したコラーゲン、架橋したコラーゲン等を用いることができる。側鎖を修飾したコラーゲンとしては、例えばサクシニル化またはメチル化したコラーゲン等が挙げられ、架橋したコラーゲンとしては、例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソアナートまたはポリエポキシ化合物等で処理したコラーゲン等を挙げることができる（フレグランス・ジャーナル 1989-12, 104-109、特公平 7-59522号公報）。

【0017】

なお、前記コラーゲンには他の生体親和性材料を混合することもできる。生体親和性材料としては、例えばゼラチン、フィブリン、アルブミン、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、キチン、キトサン、アルギン酸、ペクチン、アガロース、ハイドロキシアパタイト、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリジメチルシロキサン、またはグリコール酸、乳酸もしくはアミノ酸の重合体もしくはこれらの共重合体、またはこれらの生体親和性材料の2種類以上の混合物等が挙げられる。

【0018】

本発明における「遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド」とは、ゲノム遺伝子を

変換させるに足る長さで塩基配列を有する一本鎖のヌクレオチドである。前記オリゴヌクレオチドの長さは、少なくとも20塩基が好ましく、25～100塩基がより好ましく、30～75塩基がさらに好ましい。

【0019】

前記オリゴヌクレオチドは、遺伝子変換の効率の観点からRNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドまたはDNAオリゴヌクレオチドが好ましく、合成および精製の容易さからDNAオリゴヌクレオチドがより好ましい。

【0020】

前記オリゴヌクレオチドは、生体内または細胞内でのヌクレアーゼに耐する安定性を高めるため、分子内に1個以上の核酸類似体を有しても良い。核酸類似体とはDNA鎖あるいはRNA鎖の酵素による分解を阻害することを目的としてデザインされた類似体である。例えば、リン酸ジエステル結合部位の酸素原子を一つイオウに置換したホスホロチオエート、メチル基に置換したメチルホスホネート、もしくはアミン基に置換したホスホロアミデート、またはリン酸ジエステル結合部位の二つの酸素原子をイオウに置換したホスホロジチオエート、もしくは一つのイオウ原子とメチル基に置換したメチルホスホロチオエート、または糖部分に化学修飾を施した2'-O-methyl RNA、2'-O-methoxyethyl RNA もしくはLocked nucleic acid (商品名) (LNA) 等を挙げることができる (バイオクリニカ、12, 166-170, 1997、Biochemistry, 41, 4503-4510, 2002)。核酸類似体がオリゴヌクレオチドに含まれる数をホスホロチオエート型核酸類似体を代表として表すと、ホスホロチオエート結合の数は、4～6個程度が好ましい。ホスホロチオエート結合は変異させる塩基から少なくとも3塩基以上離れた位置の両側に導入されることが望ましく、変異させる塩基に近づけると、却って遺伝子の変換効率が低下する傾向がある。より好ましくはオリゴヌクレオチドの両末端部位に2塩基以上連続してあることが望ましい。前記オリゴヌクレオチドは、塩基部分に化学修飾を施したものであってもよい。

【0021】

前記オリゴヌクレオチドの設計は、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基対のミスマッチ対合をほぼ中央部に含んでワトソン・クリ

ック型塩基対を形成する塩基配列を含むオリゴヌクレオチドとなるようにすることが好ましい。

【0022】

すなわち、変換対象のゲノム遺伝子の20塩基以上の塩基配列を選択し、当該配列の内部に位置する1～3塩基の塩基配列を所望する塩基配列に置換し、その余の塩基配列をワトソン・クリック型塩基対（即ち、二本鎖）を形成する相補的配列に設計したオリゴヌクレオチドを設計することが好ましい。相補的配列は、ゲノム遺伝子のセンス鎖に対するものであってもアンチセンス鎖に対するものであってもよいが、センス鎖に対するものがより好ましい。このようなオリゴヌクレオチドとゲノム遺伝子とがワトソン・クリック型塩基対を形成すると、当該塩基対合中に1～3塩基対のミスマッチ対合を含むことになる。遺伝子の変換効率を高めるためには、前記ミスマッチ対合はオリゴヌクレオチドの中央部に位置することがより好ましい。

【0023】

このような遺伝子変換用オリゴヌクレオチドを用いると、ゲノム遺伝子中の1～3塩基の変異を部位特異的に修復したり、逆にゲノム遺伝子中に1～3塩基の変異を部位特異的に導入することができる。前記変異が2塩基または3塩基の場合、当該変異は連続していてもよく、不連続であってもよい。

【0024】

また、前記遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドの設計は、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基の欠失または挿入を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を含むオリゴヌクレオチドとなるようにすることが好ましい。

【0025】

すなわち、変換対象のゲノム遺伝子の20塩基以上の塩基配列を選択し、当該配列の内部に位置する1～3塩基の塩基配列を欠失させるようにし、または当該配列の内部に1～3塩基の塩基配列を挿入するようにし、その余の塩基配列をワトソン・クリック型塩基対（即ち、二本鎖）を形成する相補的配列に設計したオリゴヌクレオチドを設計することが好ましい。相補的配列は、ゲノム遺伝子のセ

ンス鎖に対するものであってもアンチセンス鎖に対するものであってもよいが、センス鎖に対するものがより好ましい。このようなオリゴヌクレオチドとゲノム遺伝子とがワトソン・クリック型塩基対を形成すると、当該塩基対合中に1～3塩基のループを含むことになる。遺伝子の変換効率を高めるためには、前記ループはオリゴヌクレオチドの中央部に位置することがより好ましい。

【0026】

このような遺伝子変換用オリゴヌクレオチドを用いると、ゲノム遺伝子中の1～3塩基の変異を部位特異的に欠失したり、逆にゲノム遺伝子中に1～3塩基の変異を部位特異的に挿入することができる。前記変異が2塩基または3塩基の場合、当該変異は連続していてもよく、不連続であってもよい。

【0027】

RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドの設計は、前記条件に加え、例えば図1(a)に示すように、センス鎖およびアンチセンス鎖それぞれとワトソン・クリック型塩基対を形成可能な2種の塩基配列部分と、塩基対を形成しない任意の介在配列部分とが連続した塩基配列を選択することができる。RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドの設計方法については、例えば、US 5, 731, 181、US 5, 756, 325に開示されている。

【0028】

本発明の第二の態様は、少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子疾患治療剤に関するものである。

【0029】

本発明の遺伝子疾患治療剤に含まれるコラーゲンおよび遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドは、前記遺伝子変換促進剤に含まれるコラーゲンおよび遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドと同様である。

【0030】

本発明の部位特異的遺伝子変換促進剤および遺伝子疾患治療剤（以下、本発明の製剤ともいう）の剤型は、溶液状、懸濁液状、ゲル状、フィルム状、固形状（棒状、粉末状）等のいずれでもよく、用途によって選択される。例えば本発明の部位特異的遺伝子変換促進剤を用いて基材接着性細胞の遺伝子変換を行う場合

には、溶液状態あるいは懸濁液状態の製剤を細胞の培養液に添加する方法の他、細胞へのオリゴヌクレオチドの接触を高めるために、基材表面にフィルム状あるいは粉末状の製剤を固定して用いられることが望ましい。また、浮遊細胞の遺伝子変換を行う場合には、溶液状態あるいは懸濁液状態の製剤を用いることが望ましい。剤形選択の重要性は、本発明の遺伝子疾患治療剤を生体に投与して遺伝子疾患の治療を行う場合更に大きくなる。全身の細胞を標的とした治療を行う場合、製剤は血管内に投与できるよう溶液状、懸濁液状が望ましいが、一般に遺伝子治療の分野では、予期し得ない副作用の発現の可能性を極力低減するために、例えば正常細胞では遺伝子変換を行わないオリゴヌクレオチドを用いた場合でも、遺伝子変換の必要がない細胞へのオリゴヌクレオチドの導入は好ましくないと考えられている。限定された部位の細胞に対してのみ遺伝子変換を行いたい場合には、局所的な製剤の濃度を高く維持し、かつ周囲への製剤の拡散を抑制できるゲル状、フィルム状、固形状の製剤を用いることが望ましい。また、患者の細胞を *in vitro* で本発明の遺伝子疾患治療剤で処理して所望の遺伝子変換を行い、遺伝子変換された細胞を患者に移植する際に遺伝子疾患治療剤を除去する必要がある場合には、除去の容易さからフィルム状あるいは固形状の剤形が望ましい。

【0031】

これらの剤形の製造方法は、国際公開第 01/97857 号パンフレット（発明の名称：オリゴヌクレオチド導入製剤）に記載されており、本発明においてはいずれの製造方法を用いてもよい。

【0032】

以下に、溶液状、懸濁液状、ゲル状の本発明の製剤として、好ましい態様について説明する。

【0033】

本発明の製剤中のオリゴヌクレオチドが遺伝子変異を生じさせる機構は、オリゴヌクレオチドと遺伝子との相同組換え、あるいはオリゴヌクレオチドと遺伝子がハイブリッドを形成することによるミスマッチ修復によると考えられているがいずれかは定かではない。但しいずれの機構にせよ、オリゴヌクレオチドと遺伝子がオリゴヌクレオチドが標的としている部分でハイブリッドを形成する必要が

ある。通常、細胞が細胞分裂期になく、かつタンパク質を産生していない場合、遺伝子は安定な二重鎖を形成し、かつヒストンと相互作用することで高密度に凝集して核内に存在するため、外来のオリゴヌクレオチドが遺伝子の二重鎖を解離させて標的の遺伝子鎖とハイブリッドを形成することは期待できない。従って、本発明の製剤中のオリゴヌクレオチドが標的の遺伝子鎖とハイブリッドを形成して目的の遺伝子変異を行うには、オリゴヌクレオチドが核内に存在する期間中に細胞分裂に伴う遺伝子の複製、あるいはタンパク質産生に伴う遺伝子の転写のため、遺伝子の二重鎖が解離する必要がある。一般に細胞が外的要因で傷害を受けた場合、細胞のタンパク産生能及び細胞分裂能が著しく低下することが知られていることから、本発明の製剤は、製剤が接触しオリゴヌクレオチドを導入する細胞に傷害を与えないよう処方設計されることが望ましい。即ち、溶液状、懸濁液状、ゲル状の本発明の製剤は細胞と等張であることが望ましい。本発明の製剤にリン酸塩とナトリウム塩を含有する場合、リン酸塩のみ 0.1 M からリン酸塩 0.01 M、ナトリウム塩 0.14 M の範囲内で含有することが望ましく、リン酸塩 0.05 M、ナトリウム塩 0.07 M からリン酸塩 0.01 M、ナトリウム塩 0.14 M の範囲で含有することがより好ましい。

【0034】

さらに、本発明の製剤は、遺伝子変換効率を高めるためには遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体となるように製造することが好ましい。ここで、「会合体」とは、分子中に多数の正電荷を帯びたコラーゲンと負電荷を帯びたオリゴヌクレオチドとが電氣的に引き合った複合体が他のコラーゲンと会合したものを意味する。この会合体の形成は、長径約 300 nm、直径約 1.5 nm の円柱状のコラーゲン分子が主として分子の長軸方向と平行に会合するものであり、主として会合体は分子の長軸方向に伸張する。したがって、会合体は、伸張の程度により繊維状、微繊維状および粒子状等の様々な形状をとることができる。この中でも、本発明における会合体はオリゴヌクレオチドの細胞内、特に核内への移行効率の点から粒子状であることが好ましい。

【0035】

前記粒子状の会合体の長径は、300 nm～50 μ m が好ましく、300 nm

～30 μm がより好ましい。

【0036】

粒子状の会合体を形成させるためには、混合するコラーゲンとオリゴヌクレオチドの濃度と割合、塩濃度、温度、pHなどを調整する。

【0037】

塩が存在しない場合、会合体の長径は混合時のコラーゲン濃度に依存するため、上記の好ましい長径の会合体を得るには、混合時のコラーゲンの濃度が0.1～0.005重量%、より好ましくは0.05～0.005重量%であることが望ましいが、コラーゲン濃度が低下するに従って会合体を形成するオリゴヌクレオチド濃度も低下する。より好ましい会合体を高濃度を得る方法として、予めコラーゲンを0.01M～0.1Mリン酸塩および0.07M～0.14Mナトリウム塩を含有する溶液に溶解して微細な線維を形成し、これにオリゴヌクレオチドを加えてコラーゲン線維と会合体を形成する方法がある。また、コラーゲンの線維形成には温度が影響を与えるため、上記の好ましい長径の会合体を得るには、混合時の温度は1～10℃が望ましく、より好ましくは1～5℃である。

【0038】

従って、本発明の溶液状の製剤は、コラーゲンを、0.01M～0.1Mリン酸塩および0.07M～0.14Mナトリウム塩を含有する溶液に溶解し、これに同濃度のリン酸塩および同濃度のナトリウム塩を含有する遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド溶液を加えて1～10℃の温度下で攪拌することにより得られる。

【0039】

混合時のコラーゲンの濃度は、通常50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～10 mg/ml であり、混合時のオリゴヌクレオチドの濃度は、通常20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～1 mg/ml である。

【0040】

会合体を形成したコラーゲン分子数とオリゴヌクレオチドのヌクレオチドモノマー数との比は、1:1～1:200であり、好ましくは1:3～1:150、より好ましくは1:3～1:120である。

【0041】

混合時の溶液のpHは、pH5～9、好ましくはpH6～8である。

【0042】

このような条件下で本発明の製剤を製造することにより、粒子状の会合体を含む溶液状の製剤を提供することができる。

【0043】

前記溶液状の製剤中のコラーゲンの濃度は、主にインビトロでの遺伝子変換やオリゴヌクレオチドの核内局在に使用する場合、0.01～1.0重量%の範囲で含有することが好ましい。

【0044】

前記溶液状の製剤中のコラーゲンの濃度は、主にインビボでの遺伝子変換、遺伝子治療やオリゴヌクレオチドの核内局在に使用する場合、0.01～0.25重量%の範囲で含有することが好ましい。

【0045】

更に本発明の溶液状製剤は、会合体の長径の制御を目的としてスクロース、グルコース、アルギニン、を0.5～10重量%、オリゴヌクレオチドの安定化のためにEDTAを0.01～1重量%、容器及び投与器具への吸着防止のため界面活性剤を0.01～1重量%含有することができる。

【0046】

以下に、フィルム状、固形状（棒状、粉末状）の本発明の製剤として、好ましい態様について説明する。

【0047】

フィルム状、固形状製剤は上記の溶液状製剤を濃縮、乾燥して得られる。即ち上記の溶液状製剤を平面なプレート上にキャストして、40℃以下の温度で乾燥させることによりフィルム状の製剤を調製できる。また、溶液状製剤を遠心してオリゴヌクレオチドとコラーゲンの会合体を沈殿させ、その沈殿物を40℃以下で乾燥させることで粉末状の製剤を調製できる。このようにして得られた粉末状の製剤あるいは溶液状製剤を凍結乾燥して得られたスポンジ状化合物を圧縮して棒状の製剤を調製する方法、あるいは粉末状の製剤とスポンジ状製剤に少量の水

を加えて練合して高濃度の溶液とし、ノズルから押し出して40℃以下で乾燥させて棒状の製剤を調製することができる。

【0048】

フィルム状、固形状製剤では、溶液状製剤に含有された添加剤に加えて、製剤の形状を保つ目的で、アルブミン、ゼラチン、コンドロイチン硫酸、アガロース、ソルビトール、スクロース等の製剤上許容される添加剤を製剤全体の10～80重量%の範囲で含有できる。

【0049】

粉末状製剤の粒子径は、賦形剤により様々な形状を取り得るが、含有されるオリゴヌクレオチドとコラーゲンが形成する会合体の長径は、300nm～50μmが好ましく、300nm～30μmがより好ましい。

【0050】

また、棒状の固形状製剤は局所に注射的に投与できるように、直径が0.1mm～2.0mm、長さ3mm～20mmが望ましく、直径が0.3mm～1.0mm、長さ3mm～10mmがより望ましい。

【0051】

固形製剤に含有されるオリゴヌクレオチドの量は、通常固形製剤1mgあたり10μg～100μg、コラーゲン量は、通常固形製剤1mgあたり990μg～250μgである。

【0052】

本発明の第三の態様は、細胞の核内においてゲノム遺伝子上の特定の塩基を任意に変換する方法に関する。すなわち、本発明の変換方法は、本発明の部位特異的遺伝子変換促進剤を細胞に接触させることにより、当該促進剤中に含まれるオリゴヌクレオチドを接触した細胞の核内に移入、局在させ、所望の塩基の変換を行うことを特徴とする。

【0053】

変換対象の細胞は、真核細胞であれば特に制限されるものではなく、酵母、真菌、植物細胞および動物細胞などが挙げられるが、好ましくは哺乳動物細胞、酵母または真菌である。

【0054】

特定の塩基が変換されたかどうかは、本発明の遺伝子変換促進剤を接触させて一定の期間後に細胞を回収し、PCR法等により特定の塩基を含む遺伝子領域を増幅して調べることができる。

【0055】

本発明の遺伝子治療剤は、種々の遺伝子疾患の治療に使用することができる。治療対象の疾患としては、遺伝子の点変異（1～3塩基の変異を含む）、欠失変異または挿入変異（1～3塩基の変異を含む）により正常なタンパク質が発現されないことに起因する疾患があげられる。そのような疾患としては家族性ポリアミロイドニューロパチー（FAP）、ファブリ病、ウイルソン病、サラセミア、鎌形赤血球症、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症、第五因子ライデン異常症、ピオチン依存性マルチブルカルボキシラーゼ欠損症等が挙げられる。

【0056】

FAPの場合、点変異によりトランスサイレチン（TTR）の30番目のバリンがメチオニンに変異した異型TTRに起因する疾患（I型FAP）や、TTRの84番目のイソロイシンがセリンに変異した異型TTRに起因する疾患（II型FAP）などが代表例として挙げられる。また、FAPに関しては、これまで90種を越える様々なTTRの点変異によるFAPが報告されており、本遺伝子治療剤は、これらすべてのタイプのFAPに適用可能である。TTRは、主に肝臓で産生されることから、肝細胞を標的として本発明の遺伝子治療剤を投与することができる。また、異型TTRによるアミロイド沈着は眼の硝子体の白濁等を伴う視力障害をも引き起し、この障害は、本発明の遺伝子治療剤を直接眼の網膜に投与することにより治療することができる。

【0057】

本発明の遺伝子治療剤の投与方法としては、治療目的に応じて経皮、皮下、皮内、筋肉、脳内、組織、血管内投与することができる。

【0058】

本発明の遺伝子治療剤の投与量は、溶液状製剤の場合はその液量で、フィルム状剤型の場合はその面積で、棒状製剤の場合はその径と長さで、さらに粉末状製

剤の場合はその粉体体積もしくは重量で容易に調節することができる。

【0059】

本発明の遺伝子治療剤の最適な投与量は、適応疾患、投与部位、投与方法、剤型の種類、患者の性別、年齢、症状などによって異なるが、製剤中のオリゴヌクレオチドの量としては、患者に対して例えば、 $0.001\text{mg/kg} \sim 40\text{mg/kg}$ 、好ましくは $0.01\text{mg/kg} \sim 30\text{mg/kg}$ である。

【0060】

投与後の遺伝子治療剤中のオリゴヌクレオチドは、効率よくゲノム遺伝子中の変異を変換する、すなわち、変異を修復することができる。FAPの場合、遺伝子の修復の結果正常なTTRが産生され、異型TTR量は低下して、アミロイドの形成を抑制することにより、FAPの症状が改善される。

【0061】

本発明の第四の態様は、少なくともコラーゲンとオリゴヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤を提供する。本製剤においては、オリゴヌクレオチドは前記遺伝子変換用オリゴヌクレオチドの条件に合致するように設計されたものを使用することができるが、オリゴヌクレオチドとしての通常の長さを有する任意のオリゴヌクレオチドも好適に使用することができる。

【0062】

本製剤は、前記遺伝子変換促進剤と同様に種々の剤型をとることができるが、溶液状の剤型が好ましい。溶液状の本製剤に含まれるリン酸塩およびナトリウム塩の濃度は、前記と同様である。また、その他の条件（コラーゲンの濃度、コラーゲン分子数とオリゴヌクレオチドモノマー数との比、混合時の溶液のpHおよび温度など）は、前記と同様である。

【0063】

本製剤を細胞に接触させることにより、製剤中に含まれるオリゴヌクレオチドを細胞の核内に効率的に局在させることができる。オリゴヌクレオチドが細胞の核内に局在したかどうかは、当該オリゴヌクレオチドを蛍光色素等で標識しておき、蛍光顕微鏡等により観察することにより確認することができる。

【0064】

【実施例】

以下、実施例等により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。実施例において、コラーゲン濃度を示す%は、重量%を意味する。

【0065】

製造例 1

部位特異的遺伝子変換促進剤の調製

下記試験例および実施例で使用するFAPに関連するTTRの遺伝子の部位特異的変換促進剤を調製した。配列番号2～6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド3.83～50 μ Mと100 μ g/ml～1g/mlのアテロコラーゲンとを等量、0.14Mの塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)中で2℃で混合し、オリゴヌクレオチドとコラーゲンの会合体を含む溶液製剤(アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド)を調製した。

【0066】

実施例 1

HepG2 細胞での遺伝子変換率

1) 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド

FAPで最も多くみられるのは、TTRの30番目のバリンがメチオニンへ変異したFAP type I(FAP ATTR Val30Met)である。そこで、正常TTR遺伝子を有するHepG2 細胞の正常TTR遺伝子をATTR Val30Met を発現するように変換するため、図1(b)～(d)に示すようなDNAオリゴヌクレオチドを設計した。DNAオリゴヌクレオチドの最適な長さを検討するために、25mer(配列番号：2)、45mer(配列番号：3)、74mer(配列番号：4)の3種類を合成した。また、前記オリゴヌクレオチドは、ヒトTTR遺伝子に基づいて設計されたものであり、マウスおよびウサギTTR遺伝子に基づいて設計して合成した74merは、それぞれ配列番号：5および配列番号：6に記載している。

【0067】

2) トランスフェクション方法

HepG2 細胞への遺伝子導入効率を検討するために、導入するオリゴヌクレオチ

ドの5'末端をFITCで標識した。Fugene6 (Roche 製)、ExGen 500 (MBI Fermentas 製)、HVJ-リボソーム (大阪大学大学院医学系研究科、遺伝子治療学、金田安史博士より供与) または製造例1で調製したアテロコラーゲン製剤 (FITCで標識したオリゴヌクレオチドを含有) を用いて、トランスフェクション法の最適化を検討した。

【0068】

3) DNAオリゴヌクレオチドによるHepG2 細胞における遺伝子変換率の検討

前日に 2×10^5 のHepG2 細胞 (大日本製薬より購入) を12 well plate にまき、0.1 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド74 mer ($3.83 \mu\text{M}$) を $300 \mu\text{l}$ および $600 \mu\text{l}$ ずつトランスフェクションし、5日 ($300 \mu\text{l}$ 添加時) あるいは6日 ($600 \mu\text{l}$ 添加時) 後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、変異配列に相当する塩基が3'末端になるように設計した変異DNA特異的オリゴヌクレオチドを用いて異常アレル (ATTR Val30Met) のみ効率よく増幅するように設定したMASA法 (mutant allele specific amplification) とreal time PCR を用いて遺伝子変換率を算定した。

【0069】

4) アテロコラーゲンに包埋したオリゴヌクレオチドの性状の検討

$8 \mu\text{l}$ のアテロコラーゲンとオリゴヌクレオチドとの会合体 (製造例1で調製したもの) を、一本鎖DNAを染色する5倍希釈の一本鎖核酸染色蛍光試薬YOYO (モレキュラプローブ社) $2 \mu\text{l}$ と混合し、蛍光顕微鏡下で観察した。

【0070】

5) DNAオリゴヌクレオチドによるHepG2 細胞における遺伝子変換の最適条件の検討

前日に 2×10^5 のHepG2 細胞を12 well plate にまき、0.1 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド ($10 \mu\text{M}$ 25mer, $10 \mu\text{M}$ 45mer, $10 \mu\text{M}$ 74mer)、または0.5 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド ($50 \mu\text{M}$ 25mer, $25 \mu\text{M}$ 45mer, $10 \mu\text{M}$ 74mer) を $600 \mu\text{l}$ (培養液 $600 \mu\text{l}$) ずつトランスフェクションし、5日後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、MASA法とreal time PCR を用いて遺伝子変換率を算定した。

【0071】

以上の実験結果に基づき、遺伝子の変換効率の確認を行った。

【0072】

(A) オリゴヌクレオチドの細胞核内への局在率

HepG2 細胞へのDNAオリゴヌクレオチドの核内局在率は、Fugene6、ExGen 500、HVJ-リポソームおよびアテロコラーゲン製剤の中で、図2(a)、(b)に示すようにアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドがほぼ50%のHepG2細胞に取り込まれ、更に導入されたDNAオリゴヌクレオチドが核に局在していることがわかる。他の方法ではすべてこれよりも弱い蛍光を示し、核への局在率が低かった。

【0073】

(B) DNAオリゴヌクレオチドによるHepG2 細胞における遺伝子変換率

これまでの報告では、DNAオリゴヌクレオチドを使った実験では、最適なDNAオリゴヌクレオチドの長さを調べるために、25mer～74merのDNAオリゴヌクレオチドを使って遺伝子修復の効率を比較検討しており、45mer、74merのDNAオリゴヌクレオチドが比較的遺伝子修復率が高いことが知られていることから、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド74mer（配列番号：4）を用いて、HepG2細胞における遺伝子変換率を調べたところ、前記3）の条件下では300 μ l 及び600 μ l のアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド濃度：3.83 μ M）を添加した場合、それぞれ0.5%及び1%弱の遺伝子変換率であったのに対し、前記5）（オリゴヌクレオチド濃度：10 μ M）では製剤中のアテロコラーゲン濃度を0.1%から0.5%に上げ、600 μ l のアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドを600 μ l の細胞培養液に添加することにより遺伝子変換率が1%から10%に上昇した。本製剤を用いた遺伝子変換率は、一定のレベルまで用量依存的に上昇することが考えられる。尚、遺伝子変換率はアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド25mer（配列番号：2）ではアテロコラーゲン濃度が0.1%（DNAオリゴヌクレオチド濃度：10 μ M）のとき0%、0.5%（DNAオリゴヌクレオチド濃度：50 μ M）のとき約0.5%、45mer 配列番号：3）ではアテロコラーゲン濃度が0.1%

(DNAオリゴヌクレオチド濃度: $10\ \mu\text{M}$) のとき 0%, 0.5% (DNAオリゴヌクレオチド濃度: $25\ \mu\text{M}$) のとき約 1% であった。

これらの結果は、本発明の用いる DNA オリゴヌクレオチドの鎖長は、45mer 以上が望ましく、より望ましくは 74mer 以上であることを示している。

【0074】

(C) アテロコラーゲンに包埋した DNA オリゴヌクレオチドの性状の検討

前記 4) の蛍光顕微鏡による観察の結果を図 3 に示す。図 3 より DNA オリゴヌクレオチド単独では全く粒子は観察されないのに対して、0.05% アテロコラーゲン包埋 DNA オリゴヌクレオチド (配列番号: 5) では、会合体粒子が観察され、会合体粒子の平均長径は $18.73\ \mu\text{m}$ であった。

【0075】

実施例 2

DNA オリゴヌクレオチドによる家兎の眼における遺伝子変換の検討

家兎の前眼房水を除去した後、0.5% アテロコラーゲン包埋 DNA オリゴヌクレオチド ($10\ \mu\text{M}$ 74mer、配列番号: 6) または 1% アテロコラーゲン包埋 DNA オリゴヌクレオチド ($30\ \mu\text{M}$ 74mer) を硝子体に直接注入 (左眼)、あるいは硝子体切除後の硝子体に注入 (右眼) した。1ヶ月後に眼を摘出し、RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて、first strand cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、MASA 法と real time PCR を用いて、正常 TTR および ATTR Val30Met のコピー数を決めることで遺伝子変換率を算定した。

【0076】

遺伝子変換率は、ATTR Val30Met のコピー数 / (ATTR Val30Met のコピー数 + 正常 TTR 遺伝子のコピー数) $\times 100$ (%) で算定した。1% アテロコラーゲンで包埋した 74mer の DNA オリゴヌクレオチドの方が 0.5% アテロコラーゲンで包埋した 74mer の DNA オリゴヌクレオチドよりも遺伝子変換率が高かった。また、硝子体切除を施行した方がより高い遺伝子変換率 (約 1%) を示した。

【0077】

実施例 3

マウス肝臓における遺伝子変換の検討

正常および異常マウストランスサイレチン (ATTR Val30Met) 遺伝子を有するヘテロトランスジェニックマウス (変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析、前田秀一郎ら、厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業「アミロイドーシスに関する研究」平成13年度総括研究報告書、p39-41) に下記製剤1～3を投与し、遺伝子変換率を調べた。

【0078】

オリゴヌクレオチド：遺伝子変換を行う塩基を中央に配し、両末端3塩基をホスホロチオエートオリゴヌクレオチドとした74mer (配列番号：5)

製剤：製剤1：オリゴヌクレオチド10 μ M, アテロコラーゲン0.5%

製剤2：オリゴヌクレオチド10 μ M, アテロコラーゲン0.2%

製剤3：オリゴヌクレオチド10 μ M, アテロコラーゲン0.05%

投与方法：マウスの肝臓の一つの肝葉の二ヶ所に0.2ml ずつ前記製剤を直接投与 (トータル0.4ml) した。

【0079】

3週間飼育後、製剤を投与した肝葉と、製剤を投与していない肝葉を採取して遺伝子を抽出し、MASA法とreal time PCR を用いて両肝葉について全トランスサイレチン遺伝子中の正常遺伝子の割合を測定した。

【0080】

結果：製剤3投与マウスの両肝葉での正常遺伝子の割合は、製剤を投与した肝葉で60.7%、製剤を投与していない肝葉で51%であった。従って、10%の遺伝子修復効果が得られたと考えられる。製剤2投与マウスは飼育中に死亡した (原因不明)。製剤1投与マウスでも遺伝子修復効果が得られたが僅かであった。

【0081】

実施例 4

HepG2 細胞での遺伝子変換率 (2)

1) 遺伝子変換促進剤の調製

DNAオリゴヌクレオチドとして51mer のYKS-384 (配列番号：7)、配列番号7において1,2,3,47,49 および50位をLocked nucleic acid (商品名)

(LNA) に置換した YKS-382、ならびに配列番号 7 において 1, 2, 3, 10, 11, 12, 14, 34, 35, 38, 47, 49 および 50 位を Locked nucleic acid (商品名) (LNA) に置換した YKS-383 の 3 種類を合成した。また、前記オリゴヌクレオチドは、ヒト TTR 遺伝子に基づいて設計されたものである。前記製造例 1 に記載の方法により、前記 3 種類のオリゴヌクレオチドとコラーゲンの会合体を含む溶液製剤 (0.5% アテロコラーゲン包埋 DNA オリゴヌクレオチド ($10 \mu\text{M}$)) を調製した。

【0082】

2) HepG2 細胞における遺伝子変換率の検討

前日に 2×10^5 の HepG2 細胞 (大日本日製薬より購入) を 12 well plate にまき、前記 1) で調製した 0.5% アテロコラーゲン包埋 DNA オリゴヌクレオチド 51mer ($10 \mu\text{M}$) を $600 \mu\text{l}$ ずつトランスフェクションし、6 日後に細胞を回収した。対照として DNA オリゴヌクレオチド (YKS-384 (配列番号: 7)) 単独の溶液を調製し、この溶液を用いて同様にトランスフェクションした。回収した細胞から DNA を抽出し、変異配列に相当する塩基が 3' 末端になるように設計した変異 DNA 特異的オリゴヌクレオチドを用いて異常アレル (ATTR Val30Met) のみ効率よく増幅するように設定した MASA 法 (mutant allele specific amplification) と real time PCR を用いて遺伝子変換率を算定した。

【0083】

以上の実験結果に基づき、遺伝子の変換率の確認を行ったところ、アテロコラーゲン包埋 DNA オリゴヌクレオチド中の DNA オリゴヌクレオチドとして YKS-384 を用いた場合は 4%、6 個の LNA を含む YKS-382 では 10%、13 個の LNA を含む YKS-383 では 23% であった。YKS-384 単独では遺伝子変換が起らなかった。

【0084】

【発明の効果】

本発明により、細胞のゲノム遺伝子上に存在する特定の塩基対を部位特異的に変換する遺伝子変換促進剤および遺伝子疾患治療剤が提供される。本発明の製剤は、生体内分解性でかつ低抗原性であり、既に生体に投与した場合の高い安全性

が確認されているコラーゲンを用いることにより、オリゴヌクレオチドが極めて高い効率で細胞内に導入されて核に局在化でき、ゲノム遺伝子の変換を効率的に促進することができる。本発明の製剤は、オリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤としても有用である。これらの製剤を使用することにより、遺伝子治療、遺伝子変異動物および植物の作出が可能である。

【0085】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

Koken Co., Ltd.

<120> An agent for accelerating site directed gene conversion and a therapeutic agent of genetic disease

<130> P02406SP

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (29)..(39)

<223> Description of Artificial Sequence:2'-O-methyl-RNA

<220>

<222> (45)..(54)

<223> Description of Artificial Sequence:2'-O-methyl-RNA

<400> 1

atcaatgtgg ccatgcatgt gttcattttu gaacacaugc atggccacau ugaugcgcgt 60

tttcgcgc 68

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)..(3)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>

<222> (23)..(25)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 2

tgaacacatg catggccaca ttgat

25

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)..(3)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>

<222> (43)..(45)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 3

gcagcctttc tgaacacatg catggccaca ttgatggcag gactg

45

<210> 4

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)..(3)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>

<222> (72)..(74)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 4

tcccaggtgt catcagcagc ctttctgaac acatgcatgg ccacattgat ggcaggactg 60

cctcggacag catc 74

<210> 5

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)..(3)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>

<222> (72)..(74)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 5

tcccaggatc cctcagaggt ctttttgaac actttcacag ccacgtctac agcagggctg 60

cctcggacag catc 74

<210> 6

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)..(3)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>

<222> (72)..(74)

<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 6

```
tcccaggtct catcagcagc ctttttgaac acgtgcatag acacgtcgac tgcaggactg    60
cctcggacgg catc                                                    74
```

<210> 7

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA oligonucleotide

<400> 7

```
tcagcagcct ttctgaacac atgcatggcc acattgatgg caggactgcc t          51
```

【図面の簡単な説明】

【図 1】

RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドおよびDNAオリゴヌクレオチドの構造

(a) RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチド、(b) 25mer DNAオリゴヌクレオチド、(c) 45mer DNAオリゴヌクレオチド、(d) 74mer DNAオリゴヌクレオチドの構造を示す。RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドのRNA 部分 (小

文字) は2'-0- メチル-RNAに、DNAオリゴヌクレオチドの両端から3 塩基(*) はホスホロチオエートになっており、分解を防いでいる。

【図2】

アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドのHepG2 細胞への取り込みを示す顕微鏡写真 (a)、(b)。比較のため、HVJ-リポソーム封入DNAオリゴヌクレオチドでの結果を示す(c)。倍率は、すべて100倍である。

【図3】

アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドの性状を示す顕微鏡写真

(a) : DNAオリゴヌクレオチドのみ

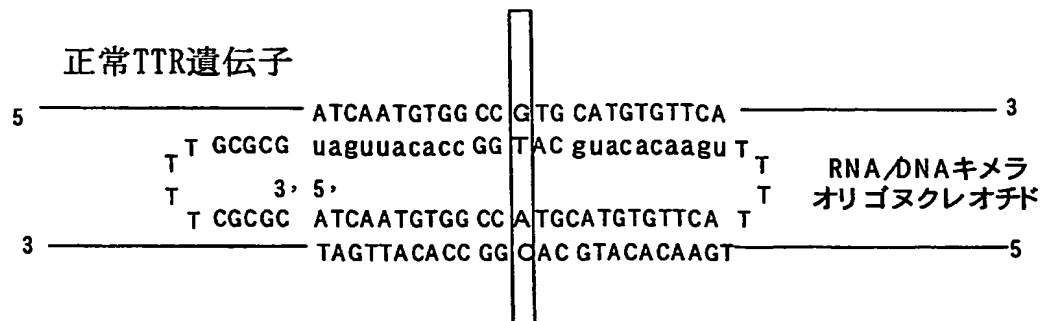
(b) : 0.05% アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド74mer

【書類名】

図面

【図 1】

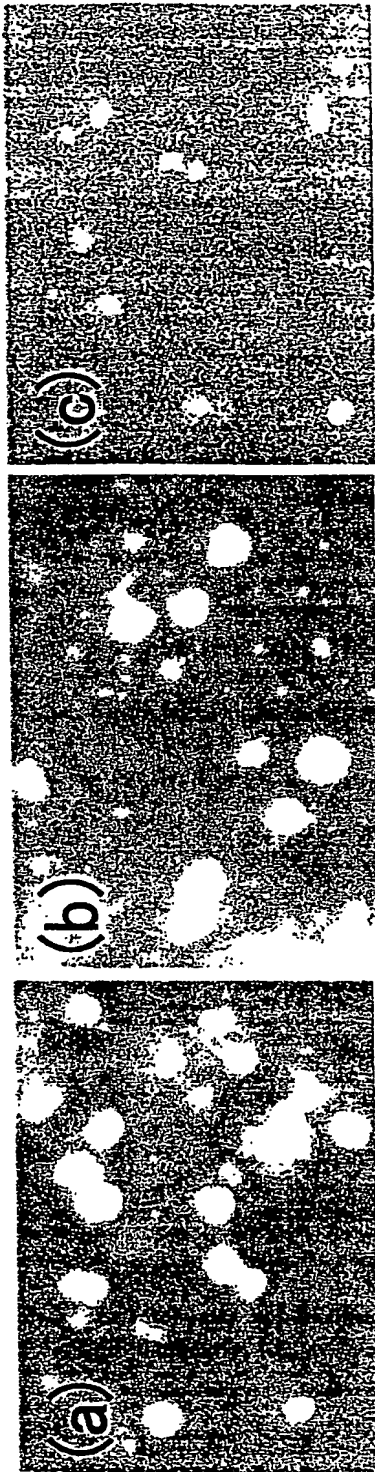
(a)



(b) 5'-T*G* A* ACA CAT GCA TGG CCA CAT TG*A* T*-3'

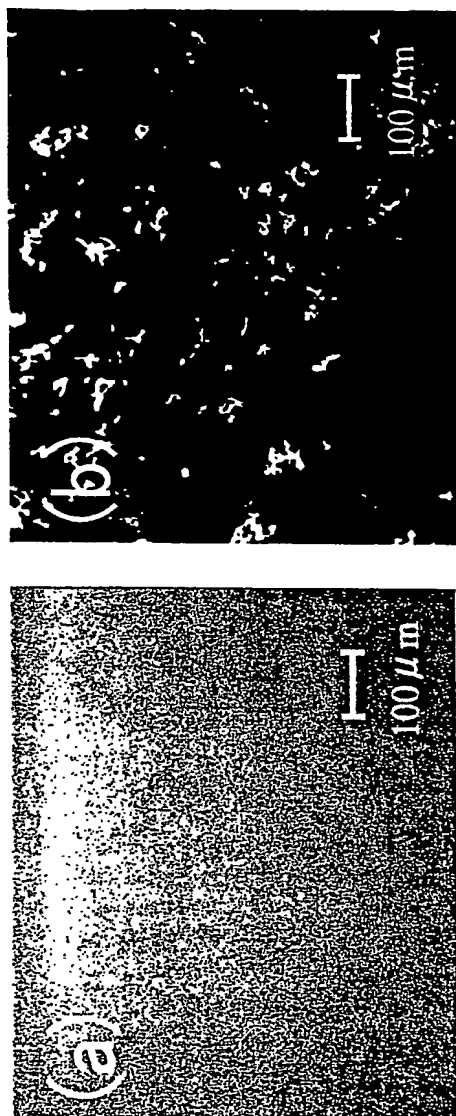
(c) 5'-G*C*A* GCC TTT CTG AAC ACA TGC ATG GCC ACA TTG ATG GCA GGA
C*T*G* -3'(d) 5'-T*C*C* CAG GTG TCA TCA GCA GCC TTT CTG AAC ACA TGC ATG GCC ACA
TTG ATG GCA GGA CTG CCT CGG ACA GCA* T*C*-3'

【図 2】



- (a) 0.01%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド
- (b) 0.1%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド
- (c) HVJ-リポソーム封入DNAオリゴヌクレオチド

【図 3】



(a) DNAオリゴヌクレオチド
(b) 0.05%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 オリゴヌクレオチドを細胞内に効率的に導入して核内での局在化を促進する製剤、目的とするゲノム遺伝子の塩基配列の変換を促進する製剤および遺伝子疾患治療剤を提供する。

【解決手段】 少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子変換促進剤、少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子疾患治療剤、細胞の核内においてゲノム遺伝子上の特定の塩基を任意に変換する方法であって、前記遺伝子変換促進剤を当該細胞に接触させることを含む方法、および少なくともコラーゲンとオリゴヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 7 4 9 2 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 8 3 3 7 0]

1 . 変 更 年 月 日

1 9 9 0 年 8 月 9 日

[変 更 理 由]

新 規 登 録

住 所

大 阪 府 大 阪 市 中 央 区 道 修 町 2 丁 目 2 番 8 号

氏 名

住 友 製 薬 株 式 会 社

特願 2002-274926

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[591071104]

1. 変更年月日

1991年 4月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都新宿区下落合3丁目5-18

氏 名

株式会社高研

2. 変更年月日

2001年 1月19日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都豊島区目白3丁目14番3号

氏 名

株式会社高研